

ULASAN

Pengawetan Spermatozoa Menggunakan Metode Pengerimbekuan

*Sperm Preservation using Freeze-Drying Method*TAKDIR SAILI^{1*}, MULYOTO PANGESTU², MOHAMAD AGUS SETIADI³,
SRIHADI AGUNGPRIYONO⁴, MOZES R. TOELIHIRE³, ARIEF BOEDIONO⁴¹Program Studi Produksi Ternak, Faperta, Universitas Haluoleo, Kendari 93121²Peneliti pada Centre for Early Human Development, Monash University, Australia³Departemen Reproduksi dan Kebidanan, FKH, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680⁴Departemen Anatomi, FKH, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diterima 22 Juni 2004/Disetujui 7 Februari 2005

Since the discovery of cryopreservation method for bull semen, cryopreservation become an alternative method for maintaining gamet resources of certain animal which is threatened or near extinction. This technology was then applied to the preservation of embryo, oocyte, ovary and testis. The application of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for which sperm motility is unnecessary had supported the effort to create simplified method such as freeze-drying for sperm preservation. Due to the benefit of ICSI over the conventional in vitro fertilization (IVF) the spermatozoon could be mechanically driven to pass through the zona pellucida and entering the cytoplasm of oocytes prior to fertilization. The freeze-drying method is an alternative method in sperm preservation which ignored the motility of sperm. The sperm resulted from this technique is in drying state, therefore, it might be stored in room temperature or in refrigerator. Many reports have claimed that freeze-dried sperm which is not motile but has an intact DNA was able to fertilize oocytes, even produced offspring in mouse.

Sejak ditemukannya metode penyimpanan spermatozoa terutama pada sapi dalam kemasan semen beku (Polge *et al.* 1949), kriopreservasi spermatozoa telah menjadi salah satu pilihan dalam upaya memanfaatkan secara maksimal dan melestarikan sumber gamet hewan jantan tertentu dari kepunahan. Metode kriopreservasi ini selanjutnya diterapkan pula untuk preservasi sel embrio (Whittingham *et al.* 1972) dan sel telur (Al-Hasani *et al.* 1987), serta jaringan ovarium (Donnez & Bassil 1998) dan testis (Kressel *et al.* 1988).

Dibanding perkembangan teknik preservasi embrio, teknik preservasi spermatozoa mengalami kemajuan yang tidak terlalu pesat. Namun demikian, beberapa penelitian mutakhir membuktikan bahwa spermatozoa yang telah matipun masih memiliki kemampuan untuk membuahi sel telur secara normal (Kuretake *et al.* 1996; Wakayama *et al.* 1998). Beberapa perlakuan yang menyebabkan rusaknya membran plasma spermatozoa seperti pemotongan ekor (Boediono 2001), pemisahan kepala dan ekor spermatozoa dengan metode sonikasi (Said & Niwa 2004; Said *et al.* 2003) dan pembekuan tanpa krioprotektan (Saili & Said 2005; Ward *et al.* 2003) akan berakibat pada kematian spermatozoa. Hal ini dapat dibuktikan melalui pewarnaan dengan eosin B. Spermatozoa yang mati akan terwarnai karena membran plasmanya telah rusak sehingga zat warna dapat masuk ke dalam sel melewati

membran sedangkan spermatozoa yang hidup tidak dapat dilewati oleh zat warna (Liu & Foote 1998).

Kenyataan ini telah membuka peluang baru dalam riset preservasi spermatozoa tanpa mempertimbangkan viabilitas spermatozoa yang dihasilkan. Beberapa penelitian membuktikan bahwa sel telur yang dibuahi oleh spermatozoa yang telah mati mampu membentuk pronukleus pada hamster (Hoshi *et al.* 1994), atau berkembang menjadi embrio pada sapi (Keskinetepe *et al.* 2001) bahkan dapat berkembang menjadi anak mencit yang normal setelah ditransfer ke resipien (Wakayama & Yanagimachi 1998). Hal tersebut dilakukan dengan metode fertilisasi buatan (fertilisasi mikro) yaitu memasukkan spermatozoon secara mekanik ke dalam sel telur. *Intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) adalah salah satu teknik fertilisasi mikro dengan memasukkan spermatozoon secara langsung ke dalam sitoplasma sel telur menggunakan alat manipulator mikro pada mikroskop.

Salah satu metode preservasi spermatozoa yang mempunyai keunggulan dibanding preservasi secara konvensional (kriopreservasi) adalah metode pengerimbekuan. Melalui metode ini, spermatozoa yang dihasilkan dalam bentuk kering dapat disimpan pada suhu kamar atau di dalam lemari es (4 °C) sehingga tidak memerlukan suplai nitrogen cair dan wadah khusus (*liquid nitrogen container*) yang merupakan syarat mutlak pada metode kriopreservasi. Selain itu spermatozoa hasil pengerimbekuan dapat ditransportasikan dari satu tempat ke tempat lain dengan mudah (Wakayama & Yanagimachi 1998).

*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-421823,
E-mail: takdir69@yahoo.com

Penelitian metode preservasi spermatozoa dengan cara pengeringbekuan telah dilakukan pada beberapa pusat penelitian baik di Amerika (Ward *et al.* 2003), Jepang (Hoshi *et al.* 1994) maupun Australia (Pangestu *et al.* 2001). Metode ini pada awalnya dikembangkan untuk menjawab permasalahan dalam mengamankan sumber gamet jantan hewan percobaan (mencit) hasil rekayasa. Beberapa laboratorium yang menggunakan hewan mencit sebagai uji coba manipulasi genetik memilih untuk mengamankan sumber gamet jantan dalam kemasan spermatozoa kering daripada memelihara pejantan mencit untuk mendapatkan sumber gamet (Kaneko *et al.* 2003; Ward *et al.* 2003). Hal ini dapat dipahami karena pemeliharaan hewan jantan memerlukan waktu dan biaya, sedangkan penyimpanan spermatozoa dalam kemasan beku di dalam nitrogen cair membutuhkan peralatan dan biaya tambahan.

Terminologi Pengeringbekuan

Istilah “*freeze-drying*” yang kemudian diterjemahkan ke dalam bahasa Indonesia menjadi “pengeringbekuan” merupakan suatu metode pengawetan keterhidupan spesimen biologi dengan dehidrasi dalam keadaan beku di bawah keadaan hampa udara (Rifai 2002). Lebih luas istilah ini juga digunakan secara umum untuk menyebut proses pembuatan kemasan materi biologi, farmasi, makanan, dan beberapa penyedap rasa dalam kemasan kering (Anonymous 2003) dan selanjutnya juga dipakai pada bidang preservasi spermatozoa. Dalam proses pengeringbekuan, spermatozoa akan mengalami proses pembekuan dan pengeringan untuk menghasilkan sediaan spermatozoa dalam bentuk kering. Produk ini dapat disimpan pada suhu kamar sebelum digunakan untuk keperluan fertilisasi sel telur.

Metode Pengeringbekuan Spermatozoa

Prinsip utama metode pengeringbekuan adalah menghilangkan kandungan air suatu bahan sebanyak $\pm 98\%$ dengan cara sublimasi. Pada prosedur ini kandungan air suatu bahan akan mengalami dua fase perubahan, yaitu membeku dan menyublim. Pada proses pembekuan, produk dalam suatu kemasan yang kedap udara akan dipaparkan pada kondisi yang menyebabkan air dalam produk tersebut membeku, sedangkan pada proses pengeringan akan dialirkan suatu tekanan udara negatif ke dalam kemasan produk sehingga padatan air mengalami proses sublimasi (Anonymous 2003).

Penggunaan metode pengeringbekuan untuk preservasi spermatozoa telah diterapkan antara lain oleh Hoshi *et al.* (1994) yang melakukan pengeringbekuan terhadap spermatozoa manusia. Sebelum melakukan pengeringbekuan, spermatozoa terlebih dahulu diseleksi dengan cara *swim up* dengan menempatkan cairan semen pada bagian dasar tabung yang berisi medium dan spermatozoa dibiarkan berenang ke permukaan medium. Spermatozoa yang mencapai permukaan medium diambil menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung 0.5 ml untuk dibekukan pada suhu -80°C . Proses pengeringbekuan dilakukan menurut prosedur Yanagida *et al.* (1991) dan Katayose *et al.* (1992) dengan

menggunakan mesin pengeringbekuan (model FO-5, Inaiseido, Japan). Spermatozoa hasil pengeringbekuan tersebut kemudian disimpan di dalam desikator dengan suhu 4°C selama seminggu, selanjutnya dapat digunakan untuk penyuntikan mikro.

Selain spermatozoa manusia yang digunakan sebagai materi dalam proses pengeringbekuan juga digunakan spermatozoa hewan. Keskinetepe *et al.* (2002) menggunakan semen beku sapi sebagai sumber spermatozoa dalam proses pengeringbekuan. Untuk membersihkan dan mendapatkan spermatozoa yang mempunyai motilitas terbaik maka semen dalam *straw* dikeluarkan dan diletakkan di bagian atas 1 ml medium *Hepes-Tyrode albumin lactate pyruvate* (Hepes-TALP) yang mengandung *Enhance-S-plus* (Conceptions Technologies Inc., San Diego, CA) dengan konsentrasi 45% pada lapisan atas dan 90% pada lapisan bawah tabung 15 ml. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan $1200 \times g$ selama 15 menit. Setelah sentrifugasi, sebanyak 0.5 ml medium pada lapisan bawah tabung dipipet secara perlahan dan dipindahkan ke tabung 15 ml yang lain sebelum dicampurkan dengan 2 ml medium Hepes-TALP. Sentrifugasi tahap kedua dilakukan pada kecepatan $300 \times g$ selama empat menit. Spermatozoa hasil sentrifugasi tersebut selanjutnya diencerkan menggunakan *modified dulbecco modified eagle medium* (DMEM, 10315-026; Gibco) hingga mencapai konsentrasi spermatozoa $0.5 \times 10^5/\text{ml}$. Selanjutnya, sebanyak 100 μl suspensi spermatozoa dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1 ml dan dicelupkan ke dalam nitrogen cair. Tabung tersebut kemudian dikeluarkan dari nitrogen cair dan dipasang pada mesin pengeringbekuan (FTS System Inc., Stone Ridge, NY) dengan suhu *pre cooled* -47°C dan *inlet pressure* 190×10^3 mBar. Proses ini berlangsung selama 12-18 jam. Kemasan tersebut ditutup rapat dan disimpan pada suhu 4°C selama satu sampai tiga bulan sebelum digunakan.

Kaneko *et al.* (2003) menggunakan spermatozoa mencit sebagai materi dalam proses pengeringbekuan. Prosedur pengeringbekuan tersebut diawali dengan mengeluarkan spermatozoa yang masih berbentuk pasta dari epididimis lalu dimasukkan secara perlahan ke bagian dasar tabung yang mengandung 1 ml larutan penyangga EGTA Tris-HCl. Selanjutnya tabung tersebut dihangatkan pada suhu 37°C selama 10 menit agar spermatozoa mengurai dari kelompoknya dan bergerak ke arah permukaan larutan. Hal ini merupakan salah satu bentuk seleksi spermatozoa. Spermatozoa yang mampu mencapai permukaan larutan merupakan spermatozoa yang mempunyai motilitas terbaik. Kemudian, sebanyak 800 μl larutan yang berada di bagian atas tabung diambil dan dimasukkan ke dalam ampul kaca berleher panjang. Dalam proses pengeringbekuan, ampul yang berisi spermatozoa tersebut dicelup terlebih dahulu ke dalam nitrogen cair selama 20 detik lalu dihubungkan dengan mesin pengeringbekuan (Freeze-Dry Systems, Labconco, Kansas City, MO). Empat jam kemudian ampul ditutup dengan cara membakar bagian ujung ampul agar tidak terjadi kontaminasi dengan udara luar. Diupayakan tekanan udara yang berada pada ampul sekitar $30-33 \times 10^{-3}$ mbar pada saat menutup ampul tersebut. Selanjutnya ampul tersebut disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

Disamping penggunaan berbagai sumber spermatozoa dalam proses pengeringbekuan, modifikasi teknik juga telah dilakukan untuk mendapatkan sediaan spermatozoa dalam bentuk kering melalui prosedur yang lebih sederhana, antara lain dilakukan oleh Mulyoto (komunikasi pribadi 2003) dengan menggunakan gas nitrogen. Modifikasi yang dimaksud meliputi penyiapan suspensi spermatozoa dengan cara penghisapan ke dalam *mini straw* 0.25 ml sampai membentuk lapisan (*sperm suspension layer*) di dinding dalam *mini straw*. Kemudian ke dalam *mini straw* ditiupkan gas nitrogen (bukan nitrogen cair), sampai lapisan tersebut mengering. Setelah kering *mini straw* tersebut dibungkus dengan *midi straw* 0.5 ml yang salah satu ujungnya sudah ditutup. Sementara meniupkan gas nitrogen ke dalam *midi straw*, ujung *midi straw* yang lain ditutup bersamaan dengan *mini straw* sehingga kemasan tersebut rapat dan gas nitrogen terperangkap di dalamnya. Hal ini sangat penting agar kandungan oksigen di dalam kedua *straw* dapat ditekan seminimal mungkin bahkan sebaiknya tidak ada sama sekali agar proses oksidasi tidak terjadi.

Kondisi Spermatozoa Sebelum dan Sesudah Pengeringbekuan

Pada tahap akhir proses spermatogenesis, histon (*somatic histone*) yang berasosiasi dengan DNA pada inti spermatozoa akan digantikan oleh suatu protein transisi dan selanjutnya akan terbentuk histon atau protamin (keduanya adalah protein sederhana yang secara bergantian menstabilkan struktur inti spermatozoa selama spermatogenesis) yang spesifik untuk spermatozoa. Penggantian protein ini dianggap bertanggungjawab terhadap penghambatan proses transkripsi pada inti dan pengompakan kromatin (*chromatin compaction*). Pada saat spermatozoa melewati epididimis, residu sistein pada protamin akan membentuk ikatan sulfida satu sama lain (Calvin & Bedford 1971). Terbentuknya ikatan ini menyebabkan daya tahan inti spermatozoa semakin tinggi terhadap pengaruh fisik dan kimia (Meistrich *et al.* 1976). Daya tahan inti spermatozoa terhadap pengaruh fisik, misalnya suhu rendah telah dibuktikan dengan lahirnya beberapa anak hasil inseminasi dengan menggunakan spermatozoa beku (Watson 1990). Selain itu, spermatozoa juga tahan terhadap suhu panas, bahkan spermatozoa yang dipapar pada suhu 90 °C selama 30 menit pun masih mampu membentuk pronukleus (Yanagida *et al.* 1991). Daya tahan inti spermatozoa terhadap proses pengeringan telah dibuktikan pula melalui pengeringbekuan spermatozoa manusia yang dilanjutkan dengan penyimpanan di dalam desikator selama beberapa bulan masih mampu mendukung pembentukan pronukleus (Katayose *et al.* 1992).

Kaneko *et al.* (2003) mengatakan bahwa proses pengeringbekuan dapat merusak komponen struktural spermatozoa. Semua spermatozoa terbukti mati setelah mengalami pengeringbekuan yang menggambarkan bahwa membran plasma spermatozoa mengalami kerusakan yang berat. Selain itu beberapa spermatozoa juga mengalami pemisahan antara bagian kepala dan ekor. Hal ini mungkin menunjukkan bahwa bagian pertemuan ekor dan kepala spermatozoa sangat rapuh sehingga dengan sedikit goncangan fisik akan terputus. Namun demikian integritas

genetik spermatozoa masih tetap terjaga yang dibuktikan melalui pemeriksaan kromosom dan kemampuan spermatozoa mendukung perkembangan sel telur.

Kusakabe *et al.* (2001) melaporkan bahwa perkembangan sel telur pada hewan mencit yang disuntik spermatozoa hasil pengeringbekuan dapat berlangsung dengan baik. Selain itu, juga diperoleh bukti adanya aktivasi spontan pada sel telur (hampir 90%) setelah penyuntikan kepala spermatozoa dilakukan. Hal ini menunjukkan bahwa molekul yang menyebabkan aktivasi pada spermatozoa tersebut tidak mengalami kerusakan pada proses pengeringbekuan.

Spermatozoa mencit yang dilarutkan dalam pengencer yang tidak mengandung krioprotektan, lalu dicelup ke dalam nitrogen cair ternyata semua spermatozoa mati, hal ini dibuktikan dengan metode pewarnaan. Namun demikian, pertumbuhan embrio yang normal dapat diperoleh dari oosit yang disuntik dengan kepala spermatozoa yang mati tersebut. Hal ini membuktikan bahwa asumsi tentang sel hidup dan nukleus hidup tidak sama (Wakayama & Yanagimachi 1998).

Untuk mengoptimalkan upaya perlindungan terhadap inti spermatozoa selama proses pengeringbekuan, Kaneko *et al.* (2003) menggunakan larutan penyangga *ethylene glycol-bis [beta-aminoethyl ether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA) Tris-HCl sebagai medium pelarut spermatozoa mencit. EGTA berperan menekan fungsi kation bivalen yang mendukung kerja enzim endonuklease, sehingga proses pemutusan ikatan fosfodiester pada DNA oleh enzim endonuklease tidak terjadi (Clark & Eichhorn 1974). Selain itu, perlindungan terhadap inti spermatozoa juga dapat dilakukan dengan mengatur pH medium pelarut spermatozoa. Enzim DNase I berfungsi optimal pada pH 7 dan stabil pada pH 5-6 sehingga jika dipapar pada medium dengan pH tinggi aktivitas enzim tersebut dalam merusak struktur DNA akan terganggu (Kunitz 1950). Kaneko *et al.* (2003) melaporkan bahwa pelarut spermatozoa pada saat pengeringbekuan dengan pH 8.0 akan mampu mempertahankan integritas kromosom dan perkembangan spermatozoa lebih lanjut.

Kemampuan Spermatozoa Hasil Pengeringbekuan untuk Membuahi Sel Telur melalui Teknik ICSI

Pada awalnya penggunaan spermatozoa hasil pengeringbekuan pada manusia dan sapi memberikan hasil yang tidak menggembirakan, namun penggunaan teknik ICSI telah mengubah pendapat tersebut dengan lahirnya beberapa hewan hasil ICSI yang menggunakan spermatozoa hasil pengeringbekuan. Nampaknya spermatozoa yang telah mengalami proses pengeringbekuan walaupun tidak hidup lagi tetapi masih memiliki integritas inti sel yang terjaga sehingga dapat mendukung perkembangan sel telur lebih lanjut (Keskintepe *et al.* 2002).

Melalui prosedur ICSI, spermatozoa yang disuntikkan ke dalam sel telur tidak perlu dalam kondisi hidup atau bergerak untuk mendukung perkembangan embrio yang normal. Hal ini telah dibuktikan dengan lahirnya dua ekor anak sapi yang normal dari hasil penyuntikan sel telur menggunakan spermatozoa *immotil* yang dibekukan tanpa krioprotektan (Goto *et al.* 1990). Bukti lain dikemukakan oleh Said dan Niwa

(2004) yang melaporkan bahwa spermatozoa yang diidentifikasi mati dengan uji viabilitas menggunakan *sperm viability kit*, setelah disuntikan ke dalam sel telur masih mampu melakukan pembuahan normal dan selanjutnya tumbuh mencapai tahap blastosis. Selain itu, ICSI yang dilakukan pada manusia umumnya menggunakan spermatozoa yang terlebih dahulu diimobilisasi untuk mempermudah pelaksanaan penyuntikan sehingga keberhasilan ICSI secara nyata dapat ditingkatkan. Hal ini mungkin disebabkan semakin cepat membran plasma spermatozoa pecah maka semakin cepat pula proses penyatuan inti spermatozoa dengan sitoplasma oosit. Imobilisasi spermatozoa umumnya dilakukan dengan memotong ekor spermatozoa menggunakan pipet suntik dengan cara menekan sambil menggores ekor spermatozoa pada dasar cawan petri. Hal ini dilakukan sesaat sebelum penyuntikan agar spermatozoa menjadi tidak bergerak (*immobile*) sehingga operator dapat dengan mudah memasukkan spermatozoa ke dalam pipet suntik untuk selanjutnya disuntikkan ke dalam sel telur (Boediono 2001).

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Hasani S *et al.* 1987. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 2:695-700.
- Anonimous. 2003. The freeze-drying process. <http://www.commercialfreezedry.co.uk/process.html>. [9 Jun 2003].
- Boediono A. 2001. Sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and oocyte activation improves early development of microfertilized goat oocytes. *Reprotech* 1:29-34.
- Calvin HI, Bedford JM. 1971. Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil* 13:65-75 (Suppl).
- Clark P, Eichhorn GL. 1974. A predictable modification of enzyme specificity. Selective alteration of DNA bases by metal ions to promote cleavage specificity by deoxyribonuclease. *Biochemistry* 13:5098-5102.
- Donnez J, Bassil S. 1998. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum Reprod* 4:248-259.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet Rec* 127:517-520.
- Hoshi K, Yanagida K, Katayose H, Yazawa H. 1994. Pronuclear formation and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei. *Zygote* 2:237-242.
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. 2003. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 68:136-139.
- Katayose H, Matsuda J, Yanagimachi R. 1992. The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biol Reprod* 47:277-284.
- Keskintepe L *et al.* 2002. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 67:409-415.
- Keskintepe L, Hassan A, Khan I, Stice SL. 2001. Bovine embryo development after lyophilized sperm injection. *Theriogenology* 55:505 (Abstract).
- Kressel K *et al.* 1988. Benign testicular tumors: a case for testis preservation? *Eur Urol* 15:200-204.
- Kunitz M. 1950. Crystalline desoxyribonuclease. II. Digestion of thymus nucleic acid (desoxyribonucleic). The kinetics of the reaction. *J Gen Physiol* 33:363-377.
- Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K, Yanagimachi R. 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm head. *Biol Reprod* 55:789-795.
- Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R. 2001. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13501-13506.
- Liu Z, Foote RH. 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci* 81:1868-1873.
- Meistrich ML, Reid BO, Barcellona WJ. 1976. Changes in sperm nuclei during spermatogenesis and epididymal maturation. *Exp Cell Res* 99:72-78.
- Pangestu M, Lewin L, Shaw J, Lacham-Kaplan O, Trounson A. 2001. Evaluation of embryo development after ICSI with dried mouse spermatozoa. *Theriogenology* 55:508 (Abstract).
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666.
- Rifai MA. 2002. *Kamus Biologi*. Ed ke-2. Jakarta: Balai Pustaka.
- Said S, Niwa K. 2004. Pembuahan dan perkembangan sel telur tikus setelah disuntik spermatozoa mati. *Hayati* 11:135-138.
- Said S, Saili T, Tappa B. 2003. Pengaktifan dan pembuahan sel telur tikus setelah disuntik dengan kepala spermatozoa. *Hayati* 10:96-99.
- Saili T, Said S. 2005. The ability of rat cauda epididymal sperm cryopreserved in liquid nitrogen without cryoprotectant to form pronucleus. *J Vet* (Submitted).
- Wakayama T, Whittingham DG, Yanagimachi R. 1998. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil* 112:11-17.
- Wakayama T, Yanagimachi R. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotech* 16:639-641.
- Ward MA *et al.* 2003. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod* 69:2100-2108.
- Watson PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. Di dalam: Lemming (ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. Edinburgh: Churchill Livingstone. hlm 747-869.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 °C and -296 °C. *Science* 178:411-414.
- Yanagida K, Yanagimachi R, Perreault SD, Kleinfeld RG. 1991. Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol Reprod* 44:440-447.